

Method for producing addressed ligands matrixes on a support**Patent number:** FR2789401**Publication date:** 2000-08-11**Inventor:** LIVACHE THIERRY; LESBRE FREDERIC**Applicant:** CIS BIO INT (FR)**Classification:****- International:** *B01J19/00; C09D5/44; B01J19/00; C09D5/44; (IPC1-7): C12Q1/68; B01J19/08; C23C18/54***- european:** B01J19/00C; C09D5/44F**Application number:** FR19990001438 19990208**Priority number(s):** FR19990001438 19990208**Also published as:**

WO0047317 (A1)

EP1152821 (A1)

US6962782 (B1)

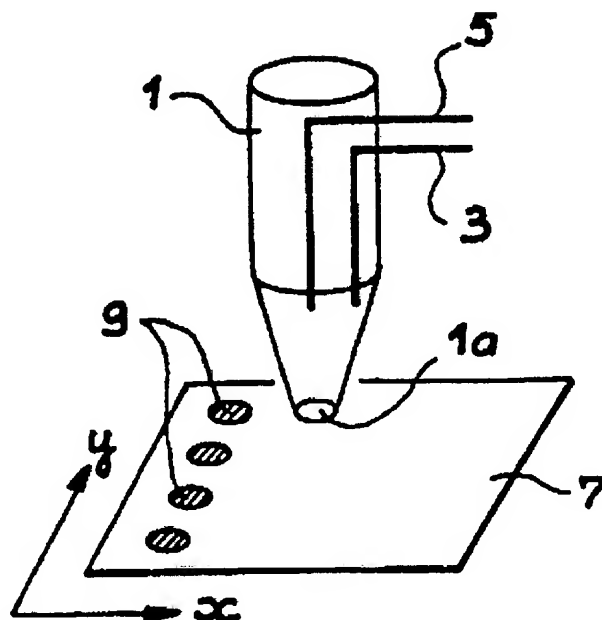
US2006032750 (A1)

EP1152821 (B1)

more >>

[Report a data error here](#)**Abstract of FR2789401**

The invention relates to a method for producing addressed ligand matrixes on a support. According to the inventive method, an element such as a reservoir (1) that is filled with a ligand and comprising an electrode (3) is used to deposit and electrochemically fix the ligand on a conducting support (7). The ligand can be an oligonucleotide or a peptide and fixing can occur by means of electrocopolymerisation of said oligonucleotide or peptide or a polypeptide containing a pyrrole group in 5' with pyrrole.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

DELPHION

No active trail

Select OR

Stop track

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

Derwent Record

Email this to

View: [Expand Details](#) Go to: [Delphion Integrated View](#)

Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#)

Derwent Title: **Production of addressable matrix of ligands, useful for analysis or library screening, involves electrochemical polymerization of ligand-modified monomer**

Original Title:  **WO0047317A1: METHOD FOR PRODUCING ADDRESSED LIGAND MATRIXES ON A SUPPORT**

Assignee: **CIS BIO INT SA** Non-standard company
COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE Standard company
Other publications from [COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE \(COMS\)...](#)

Inventor: **LESBRE F; LIVACHE T;**

Accession/Update: **2000-565264 / 200614**

IPC Code: C12N 15/09 ; C12Q 1/68 ; **B01J 19/00** ; C02F 1/40 ; **G01N 33/53** ; B01J 19/08 ; C07H 21/04 ; C12M 1/00 ; C23C 18/54 ; G01N 15/06 ; G01N 37/00 ;

Derwent Classes: **B04; J04;**

Manual Codes: **B04-B03C**(Oligonucleotides) , **B04-E01**(Nucleic acid general and other) , **B11-C08E5**(DNA hybridisation test methods, use of DNA probes) , **B12-K04F**(Tests involving DNA, hybridisation probes etc.) , **J04-B01**(Analytical methods/equipment [general])

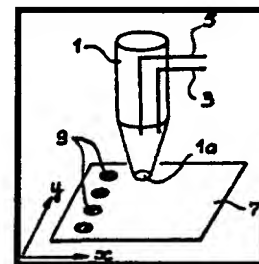
Derwent Abstract: (**WO0047317A**) **Novelty** - Preparation of a matrix (M) comprising at least one ligand (L) fixed electrochemically to a conductive support or to conductive zones of a support. At least one element (E) able to distribute L, coupled to an electropolymerizable monomer (I), is used for electrically assisted synthesis of a polymer (II), functioning as carrier of L, on the support (or its conductive zones).

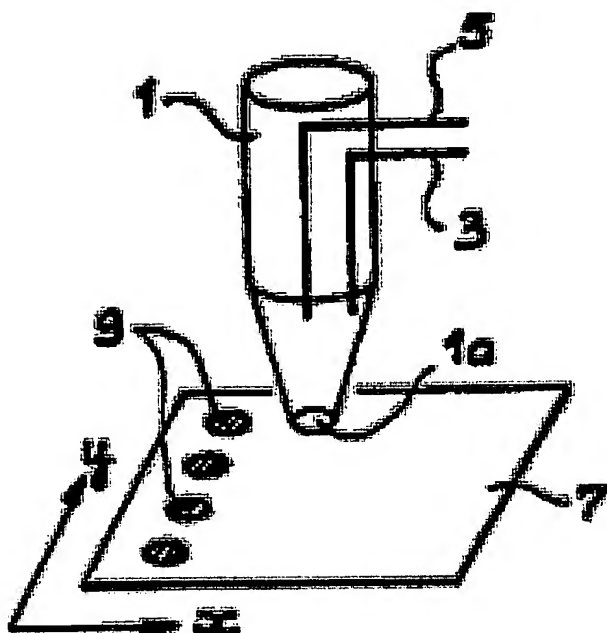
Detailed Description - An INDEPENDENT CLAIM is also included for an apparatus for preparation of M.

Use - The method is used to produce addressable ligand (L) matrices on a support, especially where L has binding activity or affinity, especially a peptide, receptor or particularly oligonucleotide probe. These matrices are used to identify components of biological samples and to screen compound libraries.

Advantage - Distribution and fixation of L is achieved in a single step, which is very rapid, simple and requires only mechanical deposition. Many L can be fixed in parallel and the support does not require modification (functionalization) or individually addressable electrodes.

Images:





Description of Drawing(s) - The figure shows a schematic diagram of the equipment used to electrochemically fix a ligand to the matrix.
Dwg.1/4

Family:	PDF Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages	Language	IPC Code
	<input checked="" type="checkbox"/> WO0047317A1 *	2000-08-17	200052	34	French	B01J 19/00
	Des. States: (N) JP US (R) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
	Local apps.: <u>WO2000FR0000289</u> Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)					
	<input checked="" type="checkbox"/> US20060032750A1 =	2006-02-16	200614	10	English	C02F 1/40
	Local apps.: Div ex <u>US06962782</u> (US 6962782) <u>US2005000155773</u> Filed:2005-06-20 (2005US-0155773) Div ex <u>US2001000890261</u> Filed:2001-08-07 (2001US-0890261) Div ex <u>WO2000FR0000289</u> Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)					
	<input checked="" type="checkbox"/> US6962782 =	2005-11-08	200574	11	English	C12Q 1/68
	Local apps.: Based on <u>WO00047317</u> (WO 200047317) <u>US2001000890261</u> Filed:2001-08-07 (2001US-0890261) <u>WO2000FR0000289</u> Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)					
	<input checked="" type="checkbox"/> DE60013777T2 =	2005-09-29	200568	14	German	B01J 19/00
	Local apps.: Based on <u>EP01152821</u> (EP 1152821) Based on <u>WO00047317</u> (WO 200047317) <u>DE2000000613777</u> Filed:2000-02-08 (2000DE-0613777) <u>EP2000000903748</u> Filed:2000-02-08 (2000EP-0903748) <u>WO2000FR0000289</u> Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)					
	<input checked="" type="checkbox"/> DE60013777E =	2004-10-21	200469		German	B01J 19/00
	Local apps.: Based on <u>EP01152821</u> (EP 1152821) Based on <u>WO00047317</u> (WO 200047317) <u>WO2000FR0000289</u> Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289) <u>EP2000000903748</u> Filed:2000-02-08 (2000EP-0903748) <u>DE2000000613777</u> Filed:2000-02-08 (2000DE-0613777)					
	<input checked="" type="checkbox"/> EP1152821B1 =	2004-09-15	200460	14	French	B01J 19/00

Des. States: (R) CH DE GB IT LI

Local appls.: Based on [WO00047317](#) (WO 200047317)[WO2000FR0000289](#) Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)[EP2000000903748](#) Filed:2000-02-08 (2000EP-0903748)

JP2002538416T2 = 2002-11-12 200275 28 English G01N 33/53

Local appls.: Based on [WO00047317](#) (WO 200047317)[WO2000FR0000289](#) Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)[JP2000000598263](#) Filed:2000-02-08 (2000JP-0598263)☒ [EP1152821A1](#) = 2001-11-14 200175 French B01J 19/00

Des. States: (R) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Local appls.: Based on [WO00047317](#) (WO 200047317)[EP2000000903748](#) Filed:2000-02-08 (2000EP-0903748)[WO2000FR0000289](#) Filed:2000-02-08 (2000WO-FR00289)☒ [FR2789401A1](#) = 2000-08-11 200052 French C12Q 1/68Local appls.: [FR1999000001438](#) Filed:1999-02-08 (99FR-0001438)? INPADOC
Legal Status:[Show legal status actions](#)? First Claim:
[Show all claims](#)

REVENDEICATIONS

? Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
FR1999000001438	1999-02-08	PROCEDE DE FABRICATION DE MATRICES DE LIGANDS ADRESSES SUR UN SUPPORT

? Chemical
Indexing Codes:[Show chemical indexing codes](#)? Specific
Compound
Numbers:[Show specific compounds](#)? Registry
Numbers:

03[M2]:1694U

? Unlinked
Registry Numbers:

1694U

? Related
Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C2000-168335	C		
1 item found			

? Title Terms:

PRODUCE ADDRESS MATRIX LIGAND USEFUL ANALYSE LIBRARY SCREEN
ELECTROCHEMICAL POLYMERISE LIGAND MODIFIED MONOMER[Pricing](#) [Current charges](#)**Derwent Searches:** [Boolean](#) | [Accession/Number](#) | [Advanced](#)

Data copyright Thomson Derwent 2003

THOMSON
★

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corp

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 789 401**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **99 01438**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 Q 1/68, C 23 C 18/54, B 01 J 19/08

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 08.02.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.08.00 Bulletin 00/32.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CIS BIO INTERNATIONAL Société
anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *LIVACHE THIERRY et LESBRE FRE-
DERIC.*

⑦3 Titulaire(s) :

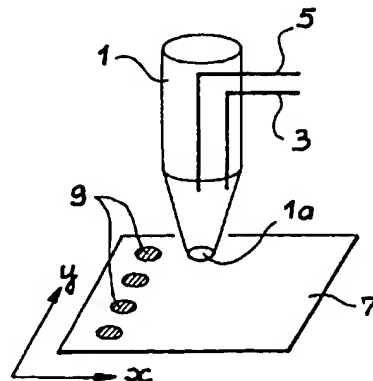
⑦4 Mandataire(s) : *BREVATOME.*

⑤4 **PROCEDE DE FABRICATION DE MATRICES DE LIGANDS ADRESSES SUR UN SUPPORT.**

⑤7 L'invention concerne un procédé de fabrication de
matrices de ligands adressés sur un support.

Selon ce procédé, on utilise un élément tel qu'un réservoir (1) rempli de ligand et comportant une électrode (3) pour déposer et fixer électrochimiquement le ligand sur le support conducteur (7).

Le ligand peut être un oligonucléotide ou un peptide et la fixation peut être obtenue par électrocopolymérisation de cet oligonucléotide ou peptide portant un groupe pyrrole en 5' avec du pyrrole.



FR 2 789 401 - A1



**PROCEDE DE FABRICATION DE MATRICES DE LIGANDS ADRESSES
SUR UN SUPPORT.**

DESCRIPTION

Domaine technique

5 La présente invention a pour objet un
procédé de fabrication de matrices de ligands adressés
sur un support.

 Les ligands peuvent être des produits
naturels ou synthétiques ayant une activité biologique
10 ou une affinité pour des molécules biologiques ou
autres, par exemple des peptides, des oligonucléotides,
des récepteurs ou d'autres molécules d'intérêt
biologique. Des matrices de ce type peuvent trouver de
nombreuses applications, notamment pour la détection et
15 l'identification de constituants dans des échantillons
biologiques ainsi que pour le criblage de bibliothèques
de molécules. De telles matrices peuvent être en
particulier des matrices de sondes oligonucléotidiques.

20 **État de la technique antérieure**

 Depuis quelques années, on a développé
plusieurs procédés de fabrications de matrices de ce
type. Ainsi, on connaît trois méthodologies dans
lesquelles on réalise l'adressage soit par voie
25 photochimique, soit par voie mécanique, soit par voie
électrochimique.

Dans le document Fodor S. et al, Science, 1991, 251, pages 767-773 [1], on a décrit un procédé de réalisation d'une matrice d'oligonucléotides par adressage photochimique. Selon ce procédé, on part d'un support fonctionnalisé par des groupes fonctionnels protégés par des groupes protecteurs photolabiles, on élimine ensuite ces groupes protecteurs, par irradiation à travers un masque, sur les sites qui devront être couplés aux molécules d'intérêt biologique, puis on réalise le couplage de ces molécules sur les groupes fonctionnels déprotégés.

Ce mode d'adressage photochimique présente l'inconvénient de nécessiter un grand nombre de masques différents pour réaliser l'ensemble des opérations de couplage.

Les documents : Khrapko K. R. et al, DNA Sequence -I.DNA Sequencing and Mapping, 1991, volume 1, pages 375 à 388 [2] et GB-A-2 319 838 [3] décrivent un procédé de fabrication de matrices par adressage mécanique. Dans le document [2], on utilise un support revêtu d'un gel de polyacrylamide que l'on active en substituant certains groupes amide par des groupes hydrazide. On fixe ensuite les oligonucléotides activés sous forme d'aldéhydes sur les groupes hydrazide en utilisant la technique de micropipetage de solutions d'oligonucléotides sur les sites sur lesquels ils devront être couplés.

Dans le cas du document [3], on part d'un support fonctionnalisé par des groupes réactifs que l'on couple à des molécules biologiques identiques. Ensuite, on découpe le support en plages individuelles correspondant chacune au couplage d'une molécule et on assemble ensuite sur une plaquette plusieurs plages

comportant des molécules différentes aux emplacements voulus.

L'emploi de ces techniques d'adressage mécanique présente l'inconvénient de nécessiter l'apport de la molécule à fixer directement sur le site à adresser. De ce fait, les dimensions du site ne peuvent être inférieures à celles de la goutte de réactif distribuée. Par ailleurs, le processus nécessite deux phases qui sont respectivement, une phase de distribution, puis une phase d'attachement covalent. De plus le support doit être modifié de telle sorte qu'une liaison covalente puisse être créée entre le support et la molécule à fixer.

Les documents : Livache T. et al, Nucleic Acids Res., 1994, 22, 15, pages 2915-2921 [4] et WO-A-94/22889 [5] décrivent des techniques d'adressages électrochimiques pour la fabrication de matrices de produits biologiques.

Dans ce cas, on part d'un support comportant plusieurs électrodes et on utilise ces électrodes pour fixer les molécules biologiques par voie électrochimique. Dans ce but, on plonge le support muni de ses électrodes dans une solution contenant la molécule à fixer, et par activation des électrodes voulues, on les recouvre de la molécule par voie électrochimique. De ce fait, les dépôts de molécules ne peuvent être réalisés que de façon successive. Par ailleurs, il est nécessaire d'utiliser un support portant des électrodes adressables individuellement, donc des systèmes complexes éventuellement multiplexés.

La présente invention a précisément pour objet un procédé de fabrication de matrices de produits biologiques sur un support, qui pallie les

inconvenients des procédés précités et qui permet de plus de réaliser l'adressage et la fixation de la molécule biologique en une seule étape, sans nécessiter une fonctionnalisation préalable du support.

5 Exposé de l'invention

A cet effet, l'invention propose un procédé de fabrication d'une matrice comprenant au moins un ligand fixé par voie électrochimique sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, dans lequel on utilise au moins un élément capable de distribuer le(s) ligand(s) comme électrode pour réaliser une fixation électriquement assistée du (des) ligand(s) sur le support conducteur ou sur les zones conductrices du support.

Selon l'invention, on utilise donc comme électrode un élément capable de distribuer le(s) ligand(s). Cet élément peut être constitué d'un réservoir contenant le ligand et comportant une partie conductrice, ou simplement être formé d'une électrode en forme de fil ou d'aiguille qui, après immersion dans un récipient contenant le ligand à fixer, est chargée par capillarité de ce ligand.

En utilisant selon l'invention une électrode formée par un tel élément, on peut mettre en contact le ligand avec le support conducteur ou les zones conductrices du support, puis le fixer directement sur le support conducteur (ou la zone conductrice) par activation électrochimique, par exemple en créant une différence de potentiel ou en générant un courant entre le support conducteur (ou la

zone conductrice) et l'élément jouant le rôle d'électrode.

Ainsi, on réalise en une seule étape la distribution et la fixation du ligand sur le support.

5 Selon un premier mode de réalisation de l'invention, ledit élément comprend un réservoir rempli du ligand et comportant un embout de distribution isolant, et au moins une électrode disposée dans ledit réservoir, ledit embout étant en contact direct avec le
10 support conducteur ou au moins une zone conductrice du support, lors de l'opération de fixation.

L'embout peut être en particulier un tube capillaire que l'on pose directement sur la surface conductrice.

15 Selon un second mode de réalisation de l'invention, ledit élément comprend un réservoir rempli de ligand et comportant un embout de distribution conducteur, le contact entre l'embout conducteur et le support conducteur ou au moins une zone conductrice du
20 support étant assuré par l'intermédiaire d'une goutte de ligand sortant de l'embout, lors de l'opération de fixation.

Dans ce cas, l'embout conducteur ne sera pas en contact avec le support conducteur ou la zone
25 conductrice. Comme précédemment l'embout conducteur peut être constitué par un tube capillaire.

Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, ledit élément est constitué par une électrode en forme de fil ou d'aiguille, chargée
30 extérieurement de ligand, le contact entre l'électrode et le support conducteur ou une zone conductrice du support étant assuré, lors de l'opération de fixation,

par l'intermédiaire d'une goutte de ligand retenue par l'électrode.

Dans les différents modes de réalisation décrits ci-dessus, le réservoir contient généralement
5 une solution du ligand à fixer et du (des) réactif(s) éventuellement nécessaires pour assurer la fixation du ligand par voie électrochimique.

On peut en particulier assurer la fixation électrochimique du ligand en le couplant à un monomère
10 électropolymérisable. Dans ce cas, la solution comprend le ligand couplé à un monomère électropolymérisable, le monomère électropolymérisable et éventuellement un agent dopant.

Le monomère électropolymérisable peut être
15 en particulier un de ceux décrits par Emr, S. et Yacynych, A. Electroanalysis, 1995, 7, pp. 913-323 [7]. Ils peuvent appartenir à deux catégories, ceux conduisant à des polymères conducteurs tels que le pyrrole, l'aniline, le thiophène ... et leurs dérivés
20 et ceux conduisant à des polymères isolants tels que des dérivés du phénol ou du benzène.

Dans ce cas, on obtient la fixation du ligand par électrocopolymérisation du monomère et du ligand couplé au monomère.

25 Le ligand peut être par exemple un oligonucléotide, un nucléotide, un acide aminé ou un peptide.

Un tel procédé de fixation électrochimique est décrit dans le document [5], dans le cas où le
30 ligand est un oligonucléotide ou un nucléotide.

Dans ce dernier cas, après avoir réalisé cette fixation, on peut allonger la chaîne de l'oligonucléotide ou du nucléotide fixé en mettant en

oeuvre les procédés de synthèse classique d'oligonucléotides par couplage successif des nucléotides voulus, mais en réalisant une déprotection électrochimique du dernier nucléotide fixé.

5 Dans le cas des peptides, on peut utiliser la même technique pour allonger la chaîne du peptide par couplage des acides aminés voulus.

L'utilisation des électrodes décrites ci-dessus pour réaliser le dépôt et la fixation par voie
10 électrochimique d'un ligand, présente les avantages suivants.

- La procédure de dépôt et de fixation est réalisée en seule étape et elle est très rapide.

- Cette technique est facile à mettre en oeuvre
15 car elle utilise simplement une technique de dépôt mécanique, à titre d'exemple par déplacement à l'aide d'une micropipette, mais en la couplant aux possibilités de résolution spatiale de l'électrochimie.

- Cette technique permet de réaliser plusieurs
20 dépôts en mode parallèle.

- Par ailleurs, ce procédé ne nécessite pas l'emploi de supports modifiés ou portant des électrodes adressables individuellement.

Dans le cas d'un support en matériau
25 conducteur, celui-ci peut être réalisé totalement en matériau conducteur de l'électricité ou être constitué d'un matériau isolant recouvert d'une couche de matériau conducteur.

Les matériaux conducteurs utilisables
30 peuvent être de divers types, il peut s'agir entre autres de métaux tels que l'or, l'argent et le platine, d'oxydes conducteurs tels que l'oxyde d'indium et

d'étain (ITO), de carbone ou de polymères organiques conducteurs.

Dans le cas où le support comprend des zones conductrices, celles-ci peuvent être réalisées dans les matériaux conducteurs cités précédemment et
5 disposées sur un support isolant.

Le support isolant peut être par exemple en verre, en silicium ou en matière plastique. On peut aussi utiliser un support en matériau conducteur dont
10 les zones conductrices sont délimitées par dépôt d'un matériau isolant à la surface du matériau conducteur.

Selon l'invention, les zones conductrices peuvent être interconnectées électriquement, ou adressables électriquement, individuellement ou par
15 groupe, pour pouvoir être activées séparément.

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre de façon à fixer des ligands identiques ou différents sur des sites conducteurs différents du support.

Dans ce cas, on peut réaliser une fixation
20 simultanée ou successive des ligands identiques ou différents en utilisant plusieurs éléments distribuant respectivement des ligands identiques ou différents. Dans ce cas, au moins deux des éléments peuvent être
25 réunis pour former une tête d'impression.

Selon une variante de réalisation de l'invention, on réalise une fixation successive d'au moins deux ligands différents sur des sites différents du support en utilisant un seul élément mais en
30 changeant au moins une fois le ligand distribué par cet élément.

Dans tous les modes de réalisation décrits ci-dessus, l'avantage principal réside dans le procédé

de distribution-couplage du ligand, qui permet la fabrication de supports portant des molécules adressées de façon extrêmement rapide.

L'invention a encore pour objet un
5 dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprenant :

- au moins un moyen de distribution d'un ligand muni d'une partie conductrice,
- 10 - des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur ou les zones conductrices du support et, d'autre part, la partie conductrice du moyen de distribution à un générateur électrique, et
- des moyens pour disposer et/ou déplacer
15 le support et/ou le(s) moyen(s) de distribution, l'un par rapport à l'autre, de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le support en des emplacements différents.

Selon l'invention, le moyen de distribution
20 peut comprendre un réservoir contenant le ligand et au moins une électrode disposée dans ledit réservoir et constituant la partie conductrice dudit moyen.

Selon une disposition particulière, le dispositif comprend plusieurs moyens de distribution de
25 ligands assemblés sous forme de tête d'impression.

Selon une variante de réalisation, ledit moyen de distribution est constitué par une électrode sous forme de fil ou d'aiguille apte à être chargée extérieurement dudit ligand.

30 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre

illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

Brève description des dessins

La figure 1 représente schématiquement un
5 élément comportant un réservoir de distribution d'un
ligand et au moins une électrode pour fixer le ligand
sur un support conducteur.

La figure 2 représente un élément analogue
à celui de la figure 1 pour réaliser la fixation d'un
10 ligand sur un support conducteur muni de zones
conductrices interconnectées électriquement.

La figure 3 représente à une échelle
agrandie l'embout du réservoir de distribution de la
figure 1, pour réaliser la fixation du ligand sur un
15 support comportant des zones conductrices multiplexées.

Les figures 4A et 4B illustrent les étapes
nécessaires pour réaliser la fixation d'un ligand sur
un support conducteur en utilisant une électrode sous
forme de fil.

20 La figure 5 représente un élément de
distribution, muni d'une entrée et d'une sortie de
fluide pour assurer son remplissage et sa vidange,
entre deux opérations de fixation de ligands
différents.

25 La figure 6 représente schématiquement une
tête d'impression comportant plusieurs réservoirs de
distribution de ligands identiques ou différents.

Exposé détaillé des modes de réalisation

Sur la figure 1, on a représenté le premier mode de réalisation de l'invention dans lequel on utilise comme électrode un élément comprenant un réservoir 1 rempli du ligand à fixer et comportant un embout de distribution 1a. A l'intérieur du réservoir 1 sont disposées une contre-électrode 3 réalisée par exemple en platine ou en or, et une électrode de référence 5.

10 Le réservoir peut contenir un volume réactionnel suffisant pour assurer un certain nombre de dépôts, pouvant aller, par exemple jusqu'à un millier.

Dans ce premier mode de réalisation représenté sur la figure 1, on utilise un support conducteur 7 qui peut comporter un substrat en verre recouvert d'une couche d'or.

Sur cette figure, on a représenté les dépôts 9 effectués avec un tel réservoir en déplaçant par exemple le support selon les directions x et y entre deux dépôts. Dans le cas où l'embout 1a du réservoir, ayant par exemple la forme d'un tube capillaire, est réalisé en matériau isolant, celui-ci peut être posé sur le support conducteur 7 et par création d'une différence de potentiel ou de courant entre la surface conductrice 7 et la contre-électrode 3, on peut obtenir les dépôts 9 qui sont fixés sur la surface conductrice 7 par impulsion électrique. Dans ce cas, la dimension des dépôts 9 est fixée par les dimensions de l'interface réservoir/support située dans les lignes du champ électrique entre l'électrode et la surface conductrice. Cette interface doit être la plus

petite possible pour réduire la dimension du dépôt obtenu.

Le réservoir de la figure 1 peut aussi comporter un embout 1a en matériau conducteur. Dans ce cas, on réalise la fixation du ligand présent dans le réservoir en assurant le contact entre la surface conductrice 7 et l'électrode formée par l'embout 1a par l'intermédiaire d'une goutte sortant de l'embout 1a. Dans ce cas les dimensions des dépôts seront également réglées par l'interface entre le liquide et la surface conductrice située dans des lignes du champ électrique.

On peut améliorer la résolution des dépôts 9 en utilisant, comme représenté sur la figure 2, un support formé de zones conductrices interconnectées. Sur la figure 2, on a repris les mêmes références que sur la figure 1 pour désigner le réservoir 1 muni de son embout 1a, d'une électrode de référence 5 et d'une contre-électrode 3. Dans ce cas, le support est constitué par un support isolant 11 muni de zones conductrices 13, isolées les unes des autres mais interconnectées électriquement. Ces zones conductrices peuvent être réalisées en or sur un substrat en verre ou silicium, par exemple. Dans ce cas, on obtient les dépôts 9 en distribuant au-dessus des zones conductrices le ligand, mais seules les zones conductrices en contact avec le ligand pourront être recouvertes de celui-ci. Ainsi, les dimensions des dépôts sont réglées par les dimensions des zones conductrices 13.

Dans ce cas, le support conducteur utilisé ne comporte en réalité qu'une seule électrode ; cela simplifie énormément sa fabrication et les coûts obtenus peuvent être très bas puisque de simples

feuilles de matière plastique recouvertes par un matériau conducteur peuvent être utilisées.

L'utilisation d'un réseau de zones conductrices permet de réduire la taille des dépôts 9, mais pas d'augmenter la densité de la matrice. En effet, cette densité dépend directement de la dimension de l'interface entre l'embout capillaire 1a et le support et elle est limitée par les dimensions de l'embout.

On peut toutefois augmenter la densité de la matrice en utilisant un support comportant des zones conductrices formant des électrodes multiplexées, comme représenté sur la figure 3.

Sur cette figure 3, on a illustré l'embout 1a du réservoir 1 des figures 1 et 2 à une échelle agrandie et une partie d'un support conducteur isolant 11 muni de zones conductrices 13 qui sont reliées séparément à des moyens d'application d'un potentiel ou de courant pour être activées séparément. Dans ce cas, les dimensions des dépôts seront déterminées par les dimensions des zones conductrices 13 activées, comme il apparaît dans le cas de la figure 3. Les autres zones conductrices qui sont en contact avec le ligand ne pourront conduire à une fixation de ce dernier puisqu'elles ne sont pas électroactivées. De cette façon, on peut atteindre simultanément une haute résolution dimensionnelle et une forte densité de matriçage.

Sur les figures 4A et 4B, on a représenté un autre mode de réalisation de l'invention dans lequel l'élément capable de distribuer le ligand est constitué par une électrode en forme de fil 15.

Dans ce cas, on peut utiliser un support conducteur 7 comme représenté sur la figure 4A. Pour réaliser le dépôt du ligand, l'électrode 15 est tout d'abord plongée dans un récipient 17 contenant le ligand à fixer et elle retient ainsi une goutte 19 de ce ligand. On amène ensuite l'électrode comportant la goutte 19 de ligand au dessus du support conducteur 7, comme représenté sur la figure 4B en réalisant le contact électrique par l'intermédiaire de la goutte 19. En appliquant une impulsion électrique entre l'électrode 15 et le support conducteur 7, on assure la formation de dépôts 9 du ligand.

Après cette opération, on rince l'électrode 15 dans un bac de rinçage 21 pour qu'elle puisse servir à nouveau pour la réalisation d'un autre dépôt 9, soit avec le même ligand, soit avec un autre ligand.

Lorsqu'on utilise ce type d'électrode, la résolution des dépôts peut être moins bonne mais dans ce cas la facilité de rinçage de l'électrode 15 est un avantage déterminant.

Le procédé de l'invention est très intéressant car il permet d'une part d'utiliser un très petit volume de milieu réactionnel donc d'économiser les molécules d'intérêt biologique à coupler. Par ailleurs, on peut régler les dimensions des dépôts effectués sur le support alors que dans le cas des méthodes d'adressage mécanique impliquant des méthodes d'activation chimique classiques, la dimension des dépôts ne pouvait être inférieure à 50, voire 100 μm .

Selon l'invention, on peut très facilement réduire la dimension des dépôts, non pas en diminuant la taille de la goutte, ce qui est difficile à réaliser

en pratique, mais en réduisant la surface de la zone électroactivable. En effet, la résolution des dépôts est optimisée par le fait que, seule, l'interface électrode/support située dans les lignes du champ électrique est activable ; c'est-à-dire que si une goutte déborde à l'extérieur de cette zone, son contenu ne sera pas fixé sur la surface conductrice.

Ainsi, si le diamètre de l'interface entre les embouts la et le support conducteur est de 200 μm , et qu'on utilise une zone conductrice ne mesurant que 10 μm de côté, seule cette zone conductrice pourra être recouverte de molécules d'intérêt biologique.

Selon l'invention, on peut réaliser sur un support des dépôts 9 en ligands différents. Ceci peut être obtenu en fixant successivement au moins deux ligands différents sur des sites différents du support à partir d'un seul élément en changeant le ligand distribué par cet élément. Dans ce cas, les dépôts peuvent être effectués successivement, soit en changeant le contenu du réservoir 1 des éléments représentés sur les figures 1 et 2, soit en utilisant l'électrode de la figure 4 que l'on plonge dans des réactifs différents. On peut aussi utiliser un réservoir fixe muni de moyens d'introduction et d'évacuation de ligand, c'est-à-dire comportant un système fluide d'entrée et de sortie du ligand pour changer le contenu du réservoir sans déplacer celui-ci.

La figure 5 illustre un tel mode de réalisation du réservoir 1 muni d'une entrée lb et d'une sortie lc de liquide.

Bien entendu, on peut aussi utiliser pour réaliser des dépôts 9 de ligands identiques ou différents, plusieurs éléments tels que ceux

représentés sur les figures 1 et 4. Ces éléments peuvent être éventuellement assemblés pour former une tête d'impression comme représenté sur la figure 6.

Sur cette figure 6, on voit que la tête d'impression comprend un premier réservoir R1 rempli d'un ligand P1, un second réservoir R2 rempli du ligand P2 et un troisième réservoir R3 rempli du ligand P3. Avec une tête multiple de ce type, on peut effectuer sur la surface conductrice 7, trois dépôts simultanés
9 réalisés respectivement en les ligands P1, P2 et P3.

On précise que les dépôts peuvent être réalisés sous atmosphère inerte ou dans un milieu liquide électrochimiquement neutre et, si possible, non miscible au milieu réactionnel contenu dans le
réservoir.

Après la phase de dépôt, le support peut être rincé et utilisé de façon classique.

Les exemples suivants illustrent la réalisation de matrices d'oligonucléotides ou de peptides, à partir d'oligonucléotides ou de peptide portant un groupement pyrrole que l'on fixe sur un support conducteur en les copolymérisant par voie électrochimique avec du pyrrole, selon le procédé décrit dans le document [5] : WO-A-94/22889

25

Exemple 1

1 - Fabrication de supports portant des oligonucléotides.

Les supports conducteurs utilisés sont des plaques de verre recouvertes d'une couche de chrome (pour l'adhésion) et d'une couche continue de 0,5 μm d'or. Cette couche est reliée à la sortie « électrode de travail » d'un potentiostat EGG 283.

Deux oligonucléotides différents portant un groupement pyrrole en 5' sont copolymérisés sur ces supports. Leurs séquences sont les suivantes :

5 pyrM5 : 5' pyr(T)₁₀ GGAGCTGCTGGCGT 3'
 pyrCP : 5' pyr(T)₁₀ GCCTTGACGATACAGC 3'

Ils ont été synthétisés par la méthode décrite par Livache et al dans [5].

10 Pour la fixation de ces oligonucléotides sur le support, on utilise un milieu réactionnel comprenant 0,1M de LiClO₄, 20 mM de pyrrole et 1 μ M d'oligonucléotide portant un groupe pyrrole en 5'.

15 Cette solution est introduite dans un réservoir en polypropylène de forme conique qui contient une contre-électrode de platine (CE) connectée au potentiostat. Ce réservoir est facilement rempli par une micropipette d'un volume pouvant varier de 50 à 1000 μ l de milieu réactionnel. L'extrémité de ce cône a
20 un diamètre d'environ 0,8 mm. Des cônes plus fins ou plus gros permettent d'utiliser d'autres volumes de réactif.

25 L'extrémité du cône est placée au contact de la surface conductrice et le copolymère est fabriqué par voltamétrie cyclique (de -0,35 à +0,85V/CE à la vitesse de 100mV/s). La charge enregistrée permet de déterminer l'épaisseur du polymère formé. Après la formation de ce premier dépôt, le cône est vidé, rincé puis rempli par un nouveau milieu réactionnel contenant
30 un autre oligonucléotide. La plaque conductrice est déplacée (table x/y/z) et la même opération de copolymérisation est menée sur une autre plage de la

surface conductrice permettant la fabrication d'un dépôt portant une autre séquence oligonucléotidique.

On prépare de cette façon deux matrices comportant uniquement des oligonucléotides pyrM5 et
5 deux matrices comportant uniquement des oligonucléotides pyrCP.

On vérifie que les matrices d'oligonucléotides ainsi obtenues présentent les propriétés voulues pour détecter les oligonucléotides
10 complémentaires par hybridation.

2 - Hybridation des oligonucléotides et détection.

Les oligonucléotides complémentaires testés sont
15 les suivants :

- M5 complémentaires biotinylé : M5_{compbio} ;
- CP complémentaire biotinylé : CP_{compbio}.

L'hybridation des oligonucléotides complémentaires se déroule dans un tampon PBS (Sigma)
20 contenant 0,5 M de NaCl, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon (Sigma), 10 mM d'EDTA et 10 nM d'oligonucléotide biotinylé complémentaire. L'hybridation est conduite à 45°C dans un volume de 20 µl durant 15 min. Un rinçage rapide au PBS/NaCl est alors réalisé. La détection des
25 hybrides est alors réalisée après incubation dans une solution de PBS/NaCl contenant 0,1 mg/ml de R phycoérythrine (Molecular Probe). La fluorescence est détectée par une caméra refroidie (Hamamatsu) montée sur un microscope à épifluorescence. Les résultats sont
30 exprimés en niveaux de gris.

On observe un spot de polypyrrole d'environ 0,8 mm de diamètre dont l'intensité de fluorescence est reportée ci-dessous :

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5_{comp} bio : 110
- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP_{comp} bio : 5
- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec M5_{comp} bio : 7
- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec CP_{comp} bio : 84

5 On observe ainsi une bonne spécificité d'hybridation et un rapport signal/bruit élevé.

Exemple 2

10 On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1, pour préparer des matrices d'oligonucléotides pyrM5 et pyrCP mais en utilisant comme support conducteur un support en matière plastique recouvert d'oxyde d'indium et d'étain (ITO).

15 Les résultats obtenus avec ces matrices pour la détection des oligonucléotides complémentaires biotinylés sont les suivants :

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5_{comp} bio : 95
- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP_{comp} bio : 5
- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec M5_{comp} bio : 7
- 20 - oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec CP_{comp} bio : 105

Exemple 3

25 Dans cet exemple, on suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer une matrice d'oligonucléotides pyrM5 sur un support en or supporté par du verre, mais on utilise, comme contre-électrode, un fil de platine chargé du milieu réactionnel au lieu du réservoir muni intérieurement d'une électrode de platine.

30 Comme représenté sur la figure 4A, le fil de platine 15 est chargé du milieu réactionnel par trempage dans un réservoir 17 contenant ce milieu. Le

fil portant la goutte 19 est ensuite approché du support jusqu'au contact avec la goutte. L'impulsion électrochimique est alors réalisée. Le fil est relevé puis rincé dans l'eau. Les autres dépôts sont assurés de la même façon. On obtient ainsi des dépôts d'environ 1 mm de diamètre et une fluorescence intense est observable lorsqu'on utilise la matrice pour réaliser l'hybridation de l'oligonucléotide complémentaire. Les résultats obtenus sont les suivants :

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5_{comp} bio : 400
- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP_{comp} bio : 10

Exemple 4

De la même façon, des peptides peuvent être déposés. Des pyrroles-peptides sont synthétisés selon la procédure décrite par T. Livache et al, Biosensors and Bioelectronics 13, (1998) 629-634 [6]. Ils sont déposés selon la procédure habituelle (exemple 1). Les deux peptides ACTH (18-39) et ACTH (11-24) sont ensuite détectés par respectivement les anticorps biotinylés Mab (34-39) et Mab (18-24).

Les résultats de fluorescence après incubation avec la streptavidine phycoérythrine sont les suivants :

Peptide ACTH 18-39 avec Mab 34-39	640
Peptide ACTH 18-39 avec Mab 18-24	510
Peptide ACTH 11-24 avec Mab 34-39	10
Peptide ACTH 11-24 avec Mab 18-24	470

Références citées

- [1] : Fodor S. et al, Science, 1991, 251, pp. 767-773.
- 5 [2] : Khrapko K. R. et al, DNA Sequence -I.DNA
Sequencing and Mapping, 1991, vol.1, pp. 375-388.
- [3] : GB-A-2 319 838.
- 10 [4] : Livache T. et al, Nucleic Acids Res., 1994,
22, 15, pages 2915-2921.
- [5] : WO-A-94/22889.
- 15 [6] : T. Livache et al, Biosensors and Bioelectronics
13, (1998), pages 629-634.
- [7] : Emr, S. et Yacynych, A. Electroanalysis, 1995, 7,
pp. 913-323.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une matrice
comprenant au moins un ligand fixé par voie
5 électrochimique sur un support conducteur ou sur des
zones conductrices d'un support, dans lequel on utilise
au moins un élément capable de distribuer le(s)
ligand(s) comme électrode pour réaliser une fixation
électriquement assistée du (des) ligand(s) sur le
10 support conducteur ou sur les zones conductrices du
support.

2. Procédé selon la revendication 1, dans
lequel ledit élément est constitué d'un réservoir
contenant le ligand et comportant une partie
15 conductrice.

3. Procédé selon la revendication 2, dans
lequel le réservoir est muni de moyens d'introduction
et d'évacuation de ligand.

4. Procédé selon la revendication 1, dans
20 lequel ledit élément est constitué par une électrode en
forme de fil ou d'aiguille, chargée extérieurement de
ligand, le contact entre l'électrode et le support
conducteur ou une zone conductrice du support étant
assuré, lors de l'opération de fixation, par
25 l'intermédiaire d'une goutte de ligand retenue par
l'électrode.

5. Procédé selon l'une quelconque des
revendications 1 à 4, dans lequel on fixe simultanément
ou successivement des ligands identiques ou différents
30 sur des sites conducteurs différents du support en
utilisant plusieurs éléments distribuant respectivement
des ligands identiques ou différents.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel au moins deux des éléments sont réunis pour former une tête d'impression.

5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel on fixe successivement au moins deux ligands différents sur des sites différents du support en utilisant un seul élément et en changeant au moins une fois le ligand distribué par cet élément.

10 8. Procédé selon l'une quelconque de revendications 1 à 4, dans lequel les zones conductrices sont formées par des zones de matériau conducteur disposées sur un support isolant.

15 9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel les zones de matériau conducteur sont interconnectées électriquement.

20 10. Procédé selon la revendication 8, dans lequel les zones de matériau conducteur sont adressables électriquement, individuellement ou par groupe, pour pouvoir être activées séparément.

25 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, dans lequel le matériau conducteur est choisi dans le groupe constitué de l'or, de l'argent, du platine, de l'oxyde d'indium et d'étain (ITO), du carbone et des polymères organiques conducteurs.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le ligand est un ligand couplé à un monomère électropolymérisable.

30 13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel chaque élément distribue une solution du ligand comprenant le ligand couplé à un monomère

électropolymérisable, le monomère électropolymérisable et éventuellement un agent dopant.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, dans lequel le monomère électropolymérisable est le pyrrole.

15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, dans lequel la fixation du ligand est obtenue par électrocopolymérisation du monomère et du ligand couplé au monomère.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, dans lequel le ligand est un nucléotide, un oligonucléotide, un acide aminé ou un peptide.

17. Dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprenant :

- au moins un moyen de distribution (1, 15) d'un ligand muni d'une partie conductrice (3, 15),
- des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur (7) ou les zones conductrices (13) du support et, d'autre part, la partie conductrice (13, 15) du moyen de distribution à un générateur électrique, et
- des moyens pour disposer et/ou déplacer le support et/ou le(s) moyen(s) de distribution, l'un par rapport à l'autre, de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le support en des emplacements différents.

18. Dispositif selon la revendication 17, dans lequel ledit moyen de distribution comprend un réservoir (1) contenant le ligand et au moins une électrode (3, 5) disposée dans ledit réservoir et constituant la partie conductrice dudit moyen.

19. Dispositif selon la revendication 18, qui comprend plusieurs moyens de distribution de ligands assemblés sous forme de tête d'impression.

20. Dispositif selon la revendication 17, dans lequel ledit moyen de distribution est constitué par une électrode (15) sous forme de fil ou d'aiguille apte à être chargée extérieurement dudit ligand.

1 / 3

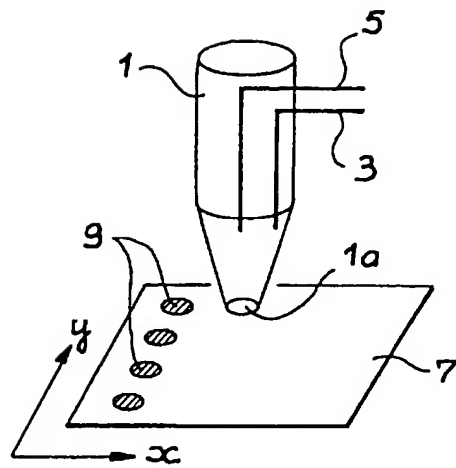


FIG. 1

FIG. 2

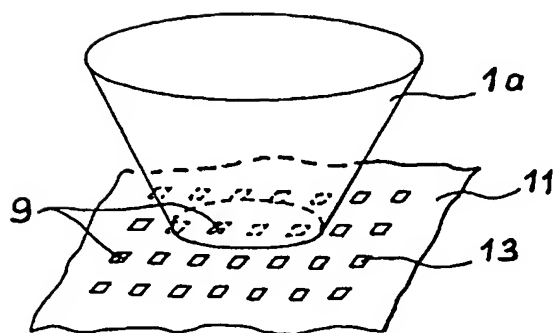
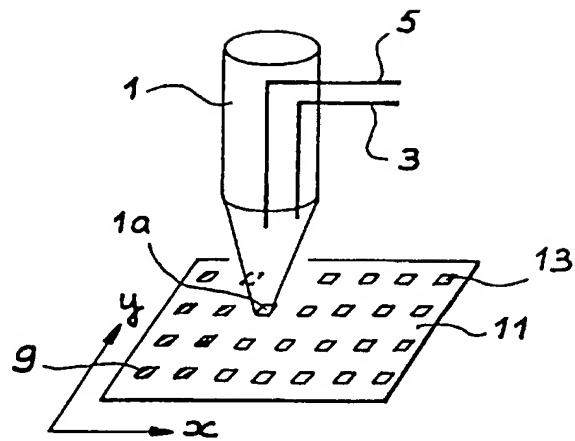


FIG. 3

2 / 3

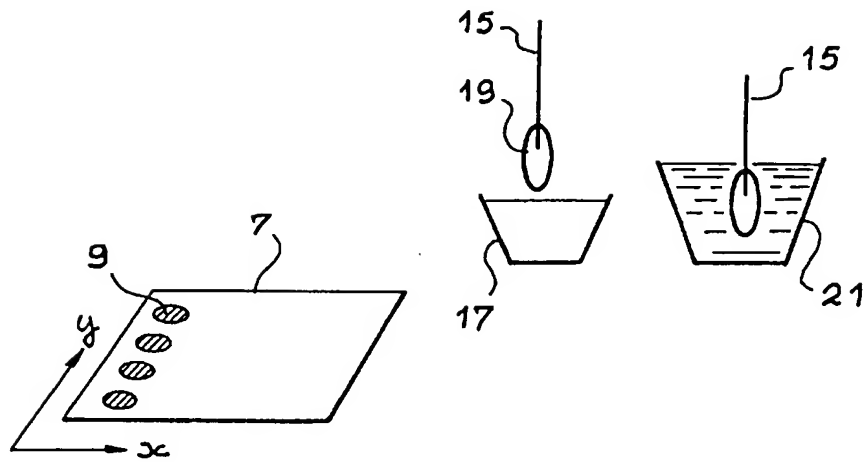


FIG. 4A

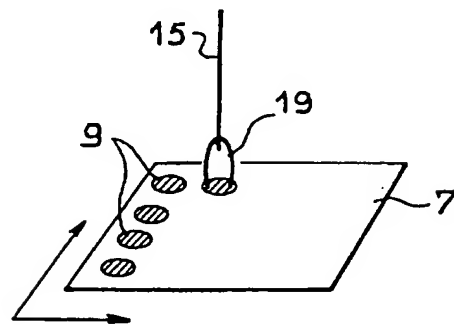


FIG. 4B

3 / 3

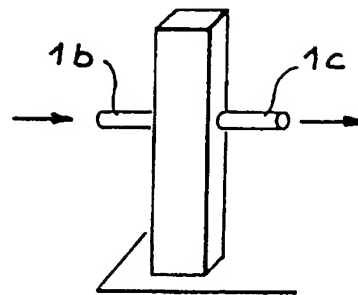


FIG. 5

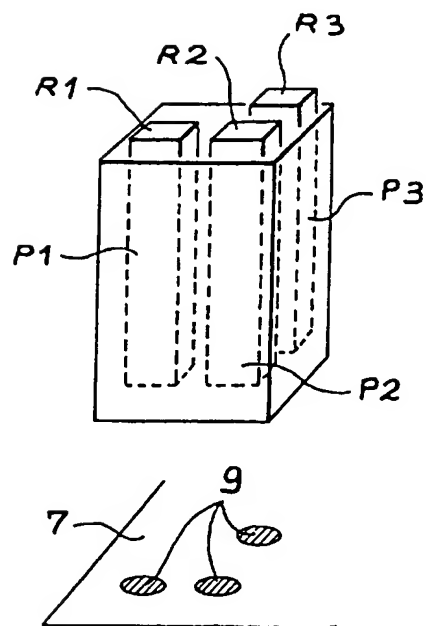


FIG. 6

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2789401

N° d'enregistrement
national

FA 571692
FR 9901438

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 98 58745 A (NEW YORK UNIVERSITY) 30 décembre 1998 (1998-12-30) * abrégé * * page 1, ligne 10 - ligne 14 * * page 6, ligne 17 - page 7, ligne 5 * * page 12, ligne 2 - ligne 33 * * revendications; figures 1-9 *	1-3,5,6, 8,9, 17-19
A	---	4,7, 10-16,20
A	US 5 486 337 A (TIHITO OHKAWA) 23 janvier 1996 (1996-01-23) * le document en entier *	1-20
A	WO 98 01221 A (COMBIMATRIX CORPORATION) 15 janvier 1998 (1998-01-15) * abrégé; revendications *	1-20
A	THIERRY LIVACHE ET AL.: "Polypyrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY., vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK., US ISSN: 0003-2697 * le document en entier *	1-20
A	US 5 828 133 A (PATRICE CAILLAT & CLAUDE MASSIT) 27 octobre 1998 (1998-10-27) * abrégé *	1-20
A	WO 97 49987 A (CELLSTAT TECHNOLOGIES) 31 décembre 1997 (1997-12-31) * abrégé *	
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
26 novembre 1999		Stevnsborg, N
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2789401

N° d'enregistrement
national

FA 571692
FR 9901438

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26 décembre 1995 (1995-12-26) -& JP 07 213926 A (HITACHI KOKI CO. LTD.), 15 août 1995 (1995-08-15) * abrégé; figures * -& DATABASE WPI Section Ch, Week 199541 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class J04, AN 1995-316145 XP002124060 & JP 07 213926 A (HITACHI KOKI K.K.), 15 août 1995 (1995-08-15) * abrégé *</p> <p>-----</p>	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
26 novembre 1999		Stevnsborg, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)